

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: B200227005

UDC _____

厦门大学

_____博 士_____学 位 论 文_____

中华哲水蚤种群遗传学研究

Studies on Population Genetics of a Marine Copepod,

Calanus sinicus Brodsky

林 元 烧

指导教师姓名: 李少菁 教授

专 业 名 称: 海洋生物学

论文提交日期: 2005 年 10 月

论文答辩时间: 2005 年 12 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 郑微云 教授 (厦门大学环科中心)

评 阅 人: 张国范 教授 (中科院海洋研究所)

评 阅 人: 成永旭 教授 (上海水产大学)

评 阅 人: 杨圣云 教授 (厦门大学海洋学系)

2005 年 10 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人签名：林元烧

2005 年 10 月 9 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（☐），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（☒）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：林元烧

日期：2005 年 10 月 9 日

导师签名：李少菁

日期：2005 年 10 月 9 日

目 录

	页码
第一章 绪论	1~23
第一节 海洋浮游桡足类种群遗传学研究意义	2
第二节 桡足类种群遗传学研究简史	6
第三节 桡足类种群遗传学研究方法简介	15
第四节 中华哲水蚤研究历史及开展本研究意义	18
第五节 研究目标, 研究内容以及拟解决的科学问题	22
第二章 材料与方法	24~37
第一节 材料	24
第二节 测定方法	26
第三节 技术路线	34
第四节 主要仪器及质控标准	35
附录 福马林溶液固定的中华哲水蚤基因组提取与 PCR 扩增	36
第三章 中华哲水蚤 mtCOI 基因片段序列	38~47
第一节 标本采集与处理	38
第二节 中华哲水蚤 mtCOI 基因片段序列	38
第三节 讨论	43
第四章 中华哲水蚤种群遗传结构	48~97
第一节 夏季黄海冷水团中华哲水蚤种群遗传结构	48
第二节 浙闽沿岸流区中华哲水蚤种群遗传结构	57
第三节 中国沿海中华哲水蚤种群遗传结构、遗传分化与基因流	73
第四节 讨论	84
参考文献	98~106

中华哲水蚤种群遗传学研究

摘 要

中华哲水蚤(*Calanus sinicus*)是西北太平洋陆架区的特征种,也是我国近海重要浮游桡足类之一。其在中国近海生态系统中的作用与地位与大西洋中的飞马哲水蚤(*C. finmarchicus*)相当。基于中华哲水蚤在海洋生态系统物流和能流中的重要地位,故被称为海洋浮游动物的“关键种”。半个世纪以来,在中华哲水蚤生物学、生态学等研究领域已积累了丰富的资料。但是,作为我国近海浮游动物的关键种,对中华哲水蚤的种群发生、增长及其补充过程和机制、生活史策略、生态对策等重大生物学和生态学问题我们仍知之甚少,许多问题诸如种群地理分化、渡夏机制等仍然悬而未决。研究中华哲水蚤的种群遗传学,是海洋生态系统动力学研究的一个重要组成部分,对于探索生态系统物质的输入和输出以及系统内部能量的运转机制具有重要意义,也是合理利用生物资源和资源保护的重要基础研究,也是研究全球环境变化对海洋生产力和产量影响的重要内容。

本文在中华哲水蚤线粒体 COI 基因片段序列的基础上,分析了中华哲水蚤的遗传多样性,遗传结构和特点,基因流模式;探讨不同地理种群(渤海,黄海,东海,台湾海峡和粤东沿岸)之间遗传差异以及在不同环境条件下种群分化的遗传学证据,探讨其生态策略等生态适应和生态进化等问题,为中华哲水蚤的种群补充、种群动力学研究以及地理分化提供科学依据。主要结果如下:

1. 2002 年 5 月份在青岛胶州湾海域采获的中华哲水蚤的 mtCOI 基因片段长度为 709 bp (与登录国际基因库,索引号 AY665663),其碱基组成 A、C、G、T 含量分别为 24.26%、19.18%、22.43%和 34.13%; C+G 含量为 41.61%, A+T 为 58.39%。与国际基因库登录(索引号 AF332769)的中华哲水蚤(日本内海) mtCOI (633bp) 比较,差异仅有 3 个位点,两者一致性(identity)达 99.53%。
2. 2002 年 8 月和 9 月在黄海中部和南部海区的 14 只雌性成体的 mtCOI 序列

(709bp) 中, 共发现有 5 个变异位点, 分别位于第 212、334、365、368 和 425 位点上, 变异类型均为转换 (transition) 类型 ($C \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow G$)。发现了 5 种单倍型; 核苷酸多样性 (π or Pi) 和单倍型多样性 (h) 分别为 0.0023 和 0.769; 遗传距离小于 0.0025。本研究并未发现不同单倍型 (基因型) 的中华哲水蚤在黄海中、南部的分布有何规律性, 更准确地说, 中华哲水蚤的各种单倍型在黄海中、南部海区呈现一种随机的分布状况。

3. 2003 年 4 月至 2004 年 6 月在浙闽沿岸流区 5 个地点 (嵊泗, 玉环, 厦门, 东山和深圳) 采集的 25 只中华哲水蚤共发现有 20 个变异位点, 15 种单倍型。核酸多样性 (π or Pi) 和单倍型多样性 (h) 分别为 0.0036 和 0.913; 平均遗传距离为 0.0036; 浙闽沿岸流区中华哲水蚤群体之间基因流值为: $F_{st} = 0.00048$; $N_m = 1.56$ 。嵊泗、玉环、厦门、东山和深圳的中华哲水蚤地方群体之间未发现有种群分化。
4. 在我国沿海各海区中华哲水蚤 (2004 年 5 月, 渤海 5 个; 黄海 14 个, 东海沿岸 20 个; 粤东沿岸 5 个) 中发现其 mtCOI 序列有 24 个变异位点, 核酸多样性 (Pi) 0.00313; 19 种单倍型, 其多样性 (h) 0.8742, 其中第 3 和第 6 类型的单倍型发生频率最高, 几乎占总受测个体的 50%。对核酸多样性和单倍型多样性分析和计算结果表明, 中国各海域中华哲水蚤基因流分别为 $F_{st} = 0.01913$; $N_m = 12.82$ 和 $G_{st} = 0.03342$; $N_m = 7.23$; 卡方检验 (Chi-square test) 和 PM(permutation test) 检验表明我国各海域中华哲水蚤没有出现种群分化 (P 值 > 0.05) 现象。

根据本研究结果推论, 中华哲水蚤的遗传多样性相对较为贫乏, 物种内缺乏生态进化的物质基础, 这使得这种桡足类只能被动适应环境; 当环境发生剧烈变动超出了这种桡足类的生存的适宜范围, 个体将死亡, 种群将消失。中华哲水蚤高基因流的遗传特性使得这种桡足类各地理群体之间缺乏基因隔离或者繁殖隔离的内秉因素, 进而也不可能出现种群分化。等位酶谱多态分析表明, 中华哲水蚤的同工酶多样性相对较高, 表明中华哲水蚤有一定的生态适应潜能, 中华哲水蚤能够

在扩布的海区里一定程度地适应当地环境条件；中国复杂的环流系统是驱动中华哲水蚤扩大分布的关键因素；而环境条件，尤其是水温，是中华哲水蚤的生存、生长、繁殖以及种群行为变化如昼夜垂直移动改变等的重要影响因素。

关键词：中华哲水蚤；桡足类；线粒体 DNA；线粒体 COI；种群遗传学

CONTENTS

	Page
Chapter 1 Introduction	1-23
Section 1 Study significance of population genetics for marine pelagic copepods	2
Section 2 Brief history of copepod population genetics	6
Section 3 Introduction of methodology to copepod population genetics	15
Section 4 Study history of <i>Calanus sinicus</i> and the present research significance	18
Section 5 Study goal, contents and scientific problems to be solved	22
Chapter 2 Material and methods	24-37
Section 1 Material	24
Section 2 Methods	26
Section 3 Technique route	34
Section 4 Important instruments and their quality standards	35
Appendix Genomic DNA purification and PCR amplification of <i>Calanus sinicus</i> fixed in formalin solution	36
Chapter 3 mtCOI sequence of <i>Calanus sinicus</i>	38-47
Section 1 Sampling and pretreatment	38
Section 2 mtCOI sequence of <i>Calanus sinicus</i>	38
Section 3 Discussion	43
Chapter 4 Population genetic structure of <i>Calanus sinicus</i> in China seas	48-97
Section 1 Population genetic structure in Yellow Sea Bottom	

	Cold Water Mass in summer	48
Section 2	Population genetic structure in Zhe-Min coastal current in winter and spring	57
Section 3	Population structure, differentiation and gene flow of <i>Calanus sinicus</i> in China seas	73
Section 4	Discussion	84
References		98-106

STUDIES ON POPULATION GENETICS OF A MARINE COPEPOD, *Calanus sinicus* Brodsky

ABSTRACT

Calanus sinicus is a characteristic copepod widely distributed in Northwest Pacific continental shelf because it dominates the mesozooplankton in the shelf ecosystem, also components a major copepod in China seas for its eggs, larvae and adults provide a wide size spectrum of food to the commercial pelagic fish stocks. Owing to it plays a most important role in the material and energy flows in ecosystem of China seas, which corresponds to an other planktonic copepod *Calanus finmarchicus* inhabited in northern Atlantic, *Calanus sinicus* is named “key species” in China seas, especially in the Bohai Sea, the Yellow Sea and the East China Sea. Although Much biological and ecological research contribution (*e.g.* Feeding, fecundity, development, growth, diel vertical migration, spatio-temporal distribution, seasonal life cycle, *etc.*) of *Calanus sinicus* has been well documented in previous field and laboratory investigations in the past about fifty years, little research field has been dealed with the maintenance mechanism of *Calanus sinicus* population dynamics, especially in population genetic diversity in China seas. We have little knowledge on the significant problems as follow as life strategy, ecological adaptation and ecological evolution, population geodiversity and differentiation, as well as oversummering of *Calanus sinicus*. Studies on the population genetics of *Calanus sinicus* is an important research field in marine ecosystem dynamic project. Population genetic analysis may yield statistical rather than deterministic conclusions about population dynamic phenomena. Thus, the destination of a particular plankton may not be predictable, but how frequently a dispersal pathway is used (*i.e.* estimation of the number of migrating individuals) may be established using population genetic statistics

of gene flow among geographic populations.

The use of genetic markers to examine population structure and patterns of gene flow has been an active area of research for recent decade. But this active research field in China has been delayed because of little knowledge on biological oceanography and molecular biology. Variation of mitochondrial DNA (mtDNA) also has been employed to examine geographic patterns of intraspecific variation. Mitochondrial traits have a distinct advantage as indicators of population structure. In the present paper, mitochondrial gene, cytochrome oxidase I (COI), of *Calanus sinicus* collected from the Bohai Sea, the Yellow Sea, the East China Sea, Taiwan Strait and Guangdong coast which together with forty-four females was investigated. Based on the analysis and calculation of the mtCOI sequences, we want to know the genetic diversity, population genetic structure, gene flow among China seas. Meanwhile, population differentiation, ecological adaptation and ecological evolution also were discussion. Goal of the present studies try to provide molecular evidence to recruitment mechanism of *Calanus sinicus* in China seas and population dispersal and geodivergence. The brief results I obtained in the studies as following.

- 1 The length of mitochondrial COI (mtCOI) of *Calanus sinicus* from Jiaozhou Bay, Qingdao sea in May 2002 was 709bp under my laboratory conditions which was logging on GenBank (assessing number AY 665663), with of A, C, G, T base composition percentage of 24.26, 19.18, 22.43 and 34.13, respectively. Of which C+G content occupied 41.61% in total 709bp mtCOI gene fragment and A+T 58.39%. Comparing to mtCOI of *Calanus sinicus* from Inland Sea, Japan (assessing number AF 332769), and three variation sites was found in mtCOI, with the identity of 99.53% in mtCOI nucleotide composition between Qingdao sea and Inland Sea.
- 2 In central and southern part of Yellow Sea, there were five variation sites met in the fourteen female *Calanus sinicus* which collected in August and

September, 2002. The five variation sites located 212th, 334th, 365th, 358th and 425th locus with mutation type transition (C↔T, A↔G). Five hyplotype (gene type) were also found in the given sea. Nucleotide diversity (π or Pi) 0.0023 and hyplotype diversity (h) 0.769. Genetic distance averagely was less than 0.0025. The population dispersal among the five hyplotype of *Calanus sinicus* individual in the Yellow Sea showed no any regularity, with a random distribution pattern in exactly saying. It could be concluded that *Calanus sinicus* dispersal in the Given sea was driven by Yellow Sea Bottom Cold Current which is a kind of density circle current only formed in summer.

- 3 Twenty of variation sites and fifteen hyplotype were found in the twenty-five mtCOI sequences of *Calanus sinicus* from Zhe-Min coastal current which originated from Changjiang estuarine and nearly disappeared about Hong Kong waters or about Hainan Island only in winter and spring. The nucleotide diversity and hyplotype of the copepod from five sampling location (Shengsi, Yuhuan, Xiamen, Dongshan and Shenzhen) from April 2003 to June 2004 were analyzed, with genetic distance between every two sequence was 0.0036 averagely. Analysis results revealed that the gene flow of *Calanus sinicus* in Zhe-Min Coastal current is $Fst = 0.00048$; $Nm = 1.56$, which indicated there was no population differentiation in the coastal waters.
- 4 Fourth-four mtCOI sequences of *Calanus sinicus* from China Seas from Bohai Sea (5 individuals collected in May 2004), Yellow Sea (14 individuals) and Zhe-Min coastal current area (25 individuals) were analyzed and found that there were twenty-four variation sites based on mtCOI of 709bp. Nucleotide diversity $Pi = 0.00313$ and hyplotype $h = 0.8742$ in the forty-four individuals. There were nineteen hyplotype found. Of which two kind of hyplotype have a frequency of nearly fifty percent in all analyzed individuals?

Based on calculation of nucleotide diversity and hyplotype diversity, the gene flow of *Calanus sinicus* in China seas, including Bohai Sea, Yellow Sea, East China Sea and Guangdong Coast, were $F_{st} = 0.01913$, $N_m = 12.82$; and $G_{st} = 0.03342$, $N_m = 7.23$ with other calculating method (Nei, 1972). The result revealed that *Calanus sinicus* was a population with high gene flow. There was still no population differentiation found in China seas by using Chi-square test and PM (permutation) test with P value > 0.05 (no significant).

It is concluded that genetic diversity of *Calanus sinicus* population is relatively poor both in nucleotide and in hyplotype because the copepod lacks gene divergence for ecological evolution that will result in that *Calanus sinicus* passively suits unflavored environments. Furthermore, the copepod will died and the population will disappeared from some sea area if they are exposed in an unfitted environmental conditions. The characteristics of high gene flow of *Calanus sinicus* populations results in absence of gene separation and reproductive isolation, further in lacks the mechanism of population divergence. The complicated circular current system in China seas is a key factor which drives the planktonic dispersal and determines the distribution patterns. Water temperature may play an important role in survival, growth, reproductive and population behavior including DVM (diel vertical migration). In contrast, the shelf of northwestern Pacific Ocean may provide a suitable habitat for *Calanus sinicus* because salinity, the available food supply, depth, etc., are ideal.

Key Words: *Calanus sinicus*; Copepod; mtDNA; mt COI;

Population Genetics

第一章 绪 论

1991 年, 由海洋研究科学委员会 (Scientific Committee on Oceanic Research, SCOR) 和联合国教科文组织 (UNESCO) 下属的国际海洋委员会 (International Oceanographic Commission, IOC) 联合发起全球海洋生态系统动力学 (Global Ocean Ecosystem Dynamics, GLOBEC) 研究计划; 1994 年召开了国际 GLOBEC 战略大会; 1997 年制定了 GLOBEC 科学计划; 1998 年召开国际 GLOBEC 科学大会; 1999 年公布了 GLOBEC 实施计划 (Implementation Plan)。上世纪九十年代, GLOBEC 紧锣密鼓地由发起到实施, 在短短的十年间, 以海洋生态系统动力学研究为核心内容成为当今海洋综合学科研究的国际前沿领域。GLOBEC 目标确定为: 提高对全球海洋生态系统及其亚系统的结构和功能以及它对物理胁迫响应的认识, 促进海洋生态系统对全球环境变化响应的预测能力 (URL: <http://www.pml.ac.uk/globec/>); 其目的在于了解全球变化如何对生态系统中主要的生物种群的丰度、多样性和生产力产生影响; 生物资源的可持续利用是 GLOBEC 计划的中心内容。

大陆架海域由于其独特的地理位置, 营养盐丰富、生物生产力高, 是世界大多数经济鱼类的主要产地。除了热带海区外, 桡足类中的哲水蚤属 (*Calanus*) 是大陆架生态系统中的大型浮游动物的主要成员, 并且是许多经济鱼类的主要饵料生物 (Uye, 2000)。这一区域的哲水蚤种群数量兴衰, 不仅影响生态系统的结构和能流, 而且对许多物理和化学过程如生源要素生物地球化学循环过程、海洋生产力过程等产生影响。我国东海, 黄海是世界海洋最为宽阔的陆架海区, 地理环境的区域特点显著, 集大河—海洋、边缘海—大洋西边界强流、大气—海洋等相互作用于一体而又形成独特环流结构的海域。虽然这一海域的面积仅占中国海面面积的 26%, 但是, 来自这一海域的渔获量占全国海洋渔业的 70%。生物多样性丰富, 优势种明显, 食物网结构复杂, 生物资源量大是这一海域的生态特点。此外, 该海域具有半封闭系统的特点和开放系统的内涵, 隐含的科学问题丰富而且凸显, 是地球科学和生命科学极为关注的综合研究海域, 也是我国近海颇具代表性的生

态系统（[唐启升, 苏纪兰等, 2000](#)）。此外, 我国东海、黄海海域毗邻日本、韩国, 这一海域成为毗邻国家的敏感区域, 有关经济专属权问题也就成了敏感的问题。因此, 研究该海域的生态动力学过程和生物资源的可持续利用具有重要的现实意义和深远的科学意义。

生物与生物之间的食物联系是生态系统的结构与功能的研究核心问题之一。浮游动物作为从初级生产者到高层捕食者的中间环节在海洋生态系统能量和物质流动中起着上接下联的枢纽作用。其下行调控着初级生产, 上行则影响上层捕食者, 浮游动物的种群补充在一定程度上决定着渔业资源的补充（[唐启升, 苏纪兰等, 2000](#)），GLOBEC 计划中一直将浮游动物动力学问题当作关键科学问题, 试图了解陆架海区生态系统中控制浮游动物输送、滞留（retention）和损失的物理和生物学过程。我国 1999 年启动的国家重大基础研究项目——东、黄海生态系统动力学和生物资源持续利用（973 项目）——将中华哲水蚤（*Calanus sinicus*）列为我国近海浮游动物的关键种之一, 重点研究其种群地理分化, 种群补充机制, 生活史包括休眠对策与复苏的生理机制, 种群动力学及种群动力学模型, 以及种群的生产力估算等问题。本研究在此背景下, 重点围绕中华哲水蚤种群地理分化和卵型问题展开研究。

第一节 海洋浮游桡足类种群遗传学研究意义

种群遗传学, 又称为群体遗传学, 是种群动力学研究的一个重要内容。恩格斯在《自然辩证法》一书中分析自然科学发展史时曾说过, “科学的发生和发展一开始就是由生产决定的”。遗传学也与其它自然科学一样, 是劳动人民在长期的生产劳动和科学实验中总结出来的经验和知识经过不断整理、凝炼和提高, 成为了科学的体系。种群遗传学是研究群体遗传结构及其变化规律的科学, 是遗传

学的分支学科；它应用数理统计学方法研究群体基因频率以及影响基因频率分布的各种因素，由此探讨进化机制。因此，群体遗传学是研究一个群体内基因的传递情况和以及在生物内外因子的影响下基因频率发生改变的学科。通过群体遗传学的研究，即通过比较不同世代、不同地理分布的群体的遗传结构及其演变方式，探讨、研究物种分化、进化过程。遗传多样性（genetic diversity）从广义上指种内或种间表现在个体、细胞和分子三个水平的遗传变异程度；狭义上则主要指种内不同群体（包括不同地理种群和季节种群）间的个体的遗传变异程度。群体遗传学的研究目的在于阐明生物进化的遗传机制，**考查各种遗传方式使群体达到平衡的速度，以及由此所达到的平衡的稳定性。只有在这种平衡被打破时才会发生演变；打破平衡的因素有突变、选择、迁移和漂变。**

环境对生物产生影响，生物也对环境产生适应。在环境与生物的相互影响过程中，生物为适应环境产生了一些新的特性和性状，这些新的特性或性状（包括生长发育、生理生化需要和遗传物质等内部环境）有利于其生存和繁衍。根据生物适应进化分子理论，在一定的环境条件下，某些具有遗传效应的 DNA 片段得到表达，产生这一遗传效应的 RNA，RNA 转译产生相应的蛋白质；这种蛋白质及其表现出的生理作用、生化功能、形态结构等适应环境条件。近年来，种群遗传学也成为种群生态学研究的热点问题。

自然种群具有三个基本特征，除了空间特征和数量特征外，还有一个重要的特征，即，遗传特征。一个种群中的生物具有一个共同的基因库（gene pool），以此区别于其他物种，但并非每个个体都具有种群中贮存的所有信息。组成种群的个体，其某些形态特征或生理特征彼此都具有差别，称为变异；这种变异和个体遗传有关。种群的个体在遗传上这种不一致性，是种群内的变异性，也是生物进化的起点，而进化则使优胜劣汰，适者生存，生存者更能适应变化的环境。这种差异通过选择（自然选择或人工选择）使变异得到积累、加强和扩散，从而逐渐地改变群体中的遗传组成，再通过自然或人为的隔离作用而形成新的物种。因此，群体中个体变异是自然种群分化、人工定向选择或自然选择和新物种形成等研究领域的基础研究。种群遗传特征正是种群遗传学的主要研究任务。

浮游桡足类是海洋中最占优势的浮游动物，种类多，数量大，是海洋生态系

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库